Journal of Plant Protection
Vol. 34, No. 3, Fall 2020, P. 287-295

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹، ص. ۲۹۵-۲۸۷

مقاله علمی-پژوهشی

مهار زیستی *Fusarium fujikuroi* عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج با استفاده از برخی باکتری‌های آنتاگونیست در استان گیلان

محمدرضا صفری مطلق[1*]- مرضیه دشتی[2]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۲۱

چکیده

در این تحقیق از مجموع ۸۰ نمونه برنج جمع‌آوری شده از شالیزارهای استان گیلان، ۱۸ سویه باکتریایی جداسازی گردید و توانایی آنتاگونیستی هشت سویه باکتریایی شامل *Bacillus subtilis*، *Bacillus circulans*، *Pseudomonas putida*، *Pseudomonas syringae*، *Pseudomonas aeruginosa*، (N47) *Pseudomonas fluorescens*، (149) *Pseudomonas fluorescens* و (CHA0) *Pseudomonas fluorescens* در آزمایشگاه و گلخانه به اثبات رسید. در روش کشت متقابل *P. putida* با ۳۹/۹۲ درصد، در روش اثر ترکیبات فرار *B. subtilis* با ۳۱/۰۱ درصد، در روش تولید سیدروفور سویه‌های (N47) *P. fluorescens* و *B. subtilis* به ترتیب با ۵۲/۱۰ و ۴۵/۸۵ درصد و در روش تولید آنتی‌بیوتیک *P. putida* با ۵۹/۲۱ درصد بیشترین تاثیر را در مهار رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری نشان دادند. این سویه‌های باکتریایی روی برنج در شرایط گلخانه‌ای، مایه‌زنی شدند. در بین باکتری‌های مورد بررسی، کمترین شدت بیماری به‌ترتیب متعلق به تیمار با باکتری‌های *P. putida* و *B. subtilis*، در مورد صفت ارتفاع بیشترین ارتفاع به‌ترتیب مربوط به تیمار با باکتری‌های *P. putida* و *B. subtilis* و در مورد صفات وزن تر و نیز وزن خشک بیشترین وزن مربوط به تیمار با باکتری *P. putida* بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده از بررسی‌های بیوکنترل در آزمایشگاه و گلخانه، سویه‌های *P. putida* و *B. subtilis* موثرترین باکتری‌ها در کنترل بیماری پوسیدگی طوقه برنج بودند.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های آنتاگونیست، برنج، مهار زیستی، *Fusarium fujikuroi*

مقدمه

پوسیدگی طوقه برنج از جمله بیماری‌های مهم در ارقام پرمحصول برنج نظیر خزر و سپیدرود می‌باشد (۱۶). کنترل بیولوژیک یکی از روش‌هایی است که امروزه سرمایه‌گذاری گسترده‌ای در دنیا روی آن انجام شده است. در تحقیق انجام شده به‌وسیله روزالس و میو (۱۷) از میان بیش از ۴۰۰ سویه باکتریایی، ۱۱۳ سویه به عنوان بازدارنده رشد میسلیومی عامل پوسیدگی طوقه برنج معرفی شدند که از طریق بهبود جوانه‌زنی گیاه برنج منجر به کاهش بیماری بین ۷۱ تا ۹۳ درصد گردیدند. لو و همکاران (۱۳)، اثر باکتری‌های آنتاگونیست علیه بیماری پوسیدگی طوقه برنج و عملکرد برنج را بررسی کردند. در مرحله جوانه‌زنی مشاهده شد که تمام پنج باکتری آنتاگونیست، کنترل خوبی بر روی عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج و تأثیر بسزایی در بهبود عملکرد برنج از خود نشان دادند. هوا و همکاران (۶) اثر کنترلی *B. subtilis* علیه بیماری پوسیدگی طوقه برنج را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که اثر کنترلی این باکتری با توجه به شرایط آزمایش قابل قبول بود و علاوه بر این، این سویه مانع جوانه‌زنی بذر و رشد جوانه برنج نشد. کومار و همکاران (۱۲)، در مطالعه‌ای نشان دادند که سویه‌های مختلف *Pseudomonas fluorescens* از طریق تولید آنزیم‌های مختلف مانند پکتیناز و نیز تولید سیدروفور به‌طور معنی‌داری رشد میسلیومی قارچ را کاهش داده و نیز باعث کاهش شدت بیماری در گلخانه شدند. در مطالعه ماتیچ و همکاران (۱۴) در مورد کنترل *F. fujikuroi* در برنج با استفاده از آنتاگونیست‌های باکتریایی مشخص گردید که تیمار بذور با باکتری‌های آنتاگونیست به همراه حرارت درمانی در کنترل بیماری موثر است. علاوه بر آن کاظم‌پور و انوری (۹) در تحقیق دیگری به این نتیجه رسیدند که سویه‌های مختلف *P. fluorescens* از طریق تولید فنازین کربوکسیلیک اسید موجب مهار

۱- دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی
(*- نویسنده مسئول: Email: ssafarimotlagh@yahoo.com)
۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، موسسه آموزش عالی دیلمان لاهیجان

DOI: 10.22067/jpp.v34i3.80386

رشد عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج می‌گردند. هدف از این تحقیق، کشت، جداسازی و شناسایی باکتری‌هایی است که خاصیت آنتاگونیستی در مقابل *F. fujikuroi* عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج نشان داده و در کنترل بیولوژیکی عامل بیماری در آزمایشگاه و گلخانه مؤثر باشند.

مواد و روش‌ها

پس از نمونه‌برداری از خزانه‌ها و مزارع آلوده و از نشا، برگ، طوقه و خوشه برنج، جداسازی و شناسایی جدایه‌های قارچی بر پایه صفات ریخت‌شناسی انجام شد. جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های متفاوت از لحاظ مشخصات پرگنه به روش کشت خطی در محیط نوترینت آگار انجام شد (۱). برای شناسایی سویه‌های باکتریایی از آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلفی شامل رنگ‌آمیزی گرم، آزمون اکسیداز، آزمون کاتالاز، رشد بی‌هوازی در محیط مایع گلوکز، تولید رنگیزه فلورسنت روی محیط کشت کینگزبی، استفاده از سیترات، هیدرولیز نشاسته، تولید اسپور، هیدرولیز ژلاتین، آزمون تحرک، استفاده از آرابینوز، استفاده از مانیتول و آزمون تولید مواد احیاکننده از سوکروز استفاده شد (۱۸). در مطالعات کنترل بیولوژیک و در آزمایشگاه از روش‌های کشت متقابل (۱۹)، اثر ترکیبات فرّار (۴)، تولید مواد سیدروفور (۵) و تولید آنتی‌بیوتیک (۱۱) استفاده شد. در مطالعات گلخانه‌ای پس از مایه‌زنی قارچ‌های بیمارگر و سویه‌های باکتریایی آنتاگونیست روی گیاه برنج، شدت بیماری محاسبه گردید (۲) و سپس ارتفاع، وزن تر، و وزن خشک بوته‌های برنج تعیین گردید. آزمایش‌های گلخانه‌ای در قالب یک طرح کاملا تصادفی با هشت تیمار و سه تکرار انجام شد. تجزیه واریانس بر اساس طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین داده‌ها به روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) انجام گرفت.

نتایج و بحث

از مجموع جدایه‌های قارچی به‌دست آمده، تعداد ۱۰ جدایه قارچی از *F. fujikuroi* برای مطالعات بیماری‌زایی و بررسی‌های کنترل بیولوژیک در آزمایشگاه و از میان این جدایه‌ها، یک جدایه قارچی برای مطالعات گلخانه‌ای انتخاب گردید. از مجموع ۱۸ سویه باکتریایی جداشده، هشت سویه باکتریایی شناسایی شده بر اساس مطالعات فنوتیپی که در این بررسی‌ها مورد استفاده قرار گرفتند عبارتند از: *Bacillus subtilis*، *Bacillus circulans*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Pseudomonas putida*، سه سویه از *Pseudomonas fluorescens* و *Pseudomonas syringe*. لازم به ذکر است که دلیل نام‌گذاری سه سویه *P. fluorescens*، تفاوت در منطقه جغرافیایی جداسازی آنها و نیز رنگ و سرعت رشد پرگنه بود که تفاوت‌هایی با هم داشتند. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس در آزمون‌های کشت متقابل، متابولیت‌های فرار و تولید آنتی‌بیوتیک بین تیمارهای مورد مطالعه از نظر درصد مهار رشد میسلیومی، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود داشت. بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین درصد مهار رشد میسلیومی به روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در کشت متقابل، بیشترین درصد مهار مربوط به تیمار *P. putida* با ۳۹/۹۲ درصد بود که با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت. کمترین درصد مهار رشد میسلیومی هم مربوط به تیمار *P. fluorescens* (N47) با ۹/۶۵ درصد بود که با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۱). در این تحقیق مجموعاً ۱۸ سویه باکتریایی از فلور طبیعی برنج، جداسازی گردید که توانایی آنتاگونیستی هشت سویه از این باکتری‌ها علیه قارچ عامل بیماری با استفاده از روش کشت متقابل به اثبات رسید. در تحقیقی کومار و همکاران (۱۲) تاثیر باکتری‌های *P. fluorescens* و *B. subtilis* در مهار زیستی *F. moniliforme* عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج را مورد بررسی قرار دادند. آنها در مجموع شش سویه از باکتری‌های *P. fluorescens* و ۳ سویه از *B. subtilis* را مورد آزمایش قرار دادند که در روش کشت متقابل به ترتیب ۵۲/۱ و ۵۸/۴ درصد باعث مهار رشد *F. moniliforme* شدند که با مطالعه حاضر مبنی بر کارآیی دو باکتری فوق در کنترل قارچ عامل بیماری در آزمایشگاه هم‌سو است. نتایج آزمون کشت متقابل سویه‌های باکتری‌های آنتاگونیست نشان داد که از مجموع هشت سویه باکتریایی، سویه‌های *P. putida* و *B. subtilis* به‌ترتیب با ۳۹/۹۲ و ۳۰/۲۲ درصد موفق به مهار رشد میسلیومی *F. moniliforme* در مقایسه با شاهد شدند که این نتیجه با نتایج به‌دست آمده از تحقیق کاناهی و همکاران (۸) و کومار و همکاران (۱۲) در مورد کارآیی این دو سویه باکتریایی در کاهش رشد بیمارگر مطابقت داشت.

همچنین بیشترین درصد مهار رشد میسلیومی به روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در آزمون متابولیت‌های فرار، مربوط به تیمار *B. subtilis* با ۳۱/۰۱ درصد بود که با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت. کمترین درصد مهار رشد میسلیومی هم مربوط به تیمار *P. syringae* بود که به‌جز تیمار *B. subtilis* با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۱). در این تحقیق تأثیر ترکیبات فرار ضد قارچی سویه‌های آنتاگونیست روی رشد *F. fujikuroi* مورد مطالعه قرار گرفت و معلوم شد که تمام این سویه‌ها، ترکیبات فراری را تولید می‌نمایند که تأثیر مطلوبی در بازداری از رشد قارچ عامل بیماری دارند و از بین آنها *B. subtilis* و *P. fluorescens* (N47) به‌ترتیب با ۳۱/۰۱ و ۳۰/۵۶ درصد بیشترین تاثیر در بازدارندگی رشد *F. fujikuroi* در مقایسه با شاهد را داشتند که این امر با یافته نوروزیان و همکاران (۱۵) مطابقت داشت.

به طور کلی در آزمون تولید آنتی‌بیوتیک، بیشترین درصد مهار مربوط به تیمارهای *P. putida* با ۵۹/۲۱ درصد و *B. subtilis* با ۵۶/۵۷ درصد بود که بین این دو تیمار و *P. aeruginosa* اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. کمترین درصد مهار رشد میسلیومی نیز مربوط به تیمار *B. circulans* با ۱۷/۵۵ درصد بود که با تیمارهای *P. fluorescens* (N47)، *P. fluorescens* (149) و *P. syringae* اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۱). در مطالعه حاضر و در آزمایش تأثیر آنتی‌بیوتیک، سویه‌های *P. putida*، *B. subtilis* به‌ترتیب با ۵۹/۲۱ و ۵۶/۵۷ درصد باعث بازدارندگی رشد *F. fujikuroi* شدند که نتیجه این تحقیق با نتایج تارا و گنانامانیکام (۲۰) و دی بوئر و همکاران (۳) مطابقت داشت.

در آزمون تولید سیدروفور، هر هشت سویه باکتریایی در محیط کشت King's B، با غلظت‌های (صفر، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار کلرید آهن III) مورد آزمایش قرار گرفتند و در هیچ یک از غلظت‌ها به جز غلظت ۱۰ میکرومولار، هاله بازدارندگی در برابر *F. fujikuroi* تشکیل نشد. بر اساس مقایسه درصد مهار رشد میسلیومی *F. fujikuroi* ناشی از تولید سیدروفور به‌وسیله هشت سویه آنتاگونیستی مختلف در غلظت ۱۰ میکرومولار در مقایسه با شاهد (محیط کشت فاقد کلرید آهن III)، مشخص گردید که سویه‌های (*P. fluorescens* (N47 و *B. subtilis* به ترتیب با ۵۲/۱۰ درصد و ۴۵/۸۵ درصد دارای بیشترین توانایی در تولید سیدروفور و ایجاد بازدارندگی در رشد قارچ عامل بیماری هستند (جدول ۱). براین اساس بین *P. fluorescens* (N47) و *B. subtilis* اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ولی بین *P. fluorescens* (N47) و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود داشت. کمترین بازدارندگی مربوط به تیمار *P. fluorescens* (CHA0) با ۱۷/۱ درصد بود که با تیمارهای *P. fluorescens* (N47)، *B. subtilis*، *P. aeruginosa* و *B. circulans* اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۱). در آزمایش تولید سیدروفور هر هشت باکتری مورد مطالعه توانستند در محیط کشت King's B شامل ۱۰ میکرومول کلرید آهن III از رشد *F. fujikuroi* جلوگیری نمایند و از بین آنها سویه‌های (*P. fluorescens* (N47 و *B. subtilis* به ترتیب با ۵۲/۱۰ و ۴۵/۸۵ درصد بیشترین کارآیی را نشان دادند. در تحقیقی کاظم‌پور و الهی‌نیا (۱۰)، در بررسی تاثیر سیدروفوری ۲۳۸ سویه باکتریایی جدا شده از ریزوسفر روی دانه‌های برنج آلوده به *F. fujikuroi*، در غلظت‌های متفاوت کلرید آهن III، به این نتیجه رسیدند که در مورد *P. fluorescens* و *Bucillus cereus* غلظت آهن بر رشد شعاعی *F. fujikuroi* موثر است.

در مطالعات گلخانه‌ای در روزهای اولیه مایه‌زنی قارچ عامل بیماری روی گیاه علائمی دیده نشد اما از روز چهارم برگ‌ها کم‌کم حالت کشیده، نازک و رنگ‌پریده پیدا کردند و در روز ششم در قسمت طوقه هم علائم پوسیدگی نمایان شد. پس از گذشت ۱۰ روز علائم بیماری کاملاً آشکار شد، بدین معنی که برگ‌ها کاملاً زرد شده و سپس علائم نکروز و در قسمت‌هایی کلروز مشاهده گردید و همچنین در قسمت طوقه، پوسیدگی تقریباً شدید ظاهر شد. در این حالت میانگین شدت بیماری ۷/۹ بود. در گیاهانی که به‌طور هم‌زمان با *F. fujikuroi* و *B. subtilis* مایه‌زنی شده بودند، اولین علائم پنج روز پس از تلقیح به‌صورت ایجاد لکه‌های کوچک زردرنگ روی طوقه و برگ برنج ظاهر شد. استفاده از این باکتری باعث کاهش شدت بیماری ایجاد شده به‌وسیله عامل بیماری، به میزان ۴۵/۵۶ درصد گردید. در گیاهانی که به‌طور هم‌زمان با *F. fujikuroi* و *B. circulans* مایه‌زنی شده بودند، این باکتری شدت بیماری ایجاد شده به‌وسیله *F. fujikuroi* را به میزان ۲۰/۷۷ درصد کاهش داد. در تلقیح هم‌زمان با عامل بیماری و *P. putida* اولین علائم شش روز پس از تلقیح به صورت لکه‌های زرد خفیف روی طوقه، ساقه و برگ برنج ظاهر شد. این باکتری ۶۲/۰۲ درصد شدت بیماری را کاهش داد. در مایه‌زنی هم‌زمان با *F. fujikuroi* و *P. syringae* اولین علائم چهار روز پس از تلقیح به‌صورت نازک‌شدن برگ‌ها و ایجاد لکه‌های کوچک متعدد بر روی طوقه، ساقه و برگ برنج ظاهر شد. این باکتری شدت بیماری را به‌میزان ۲۴/۰۵ درصد کاهش داد. در تلقیح هم‌زمان با *F. fujikuroi* و *P. aeruginosa*. شدت بیماری به میزان ۳۱/۱۶ درصد کاهش یافت. در مایه‌زنی هم‌زمان با قارچ عامل بیماری و *P. fluorescens* (N47) اولین علائم چهار روز پس از تلقیح به‌صورت لکه‌های کوچک زرد و قهوه‌ای روی برگ‌های برنج ظاهر شد. استفاده از این باکتری شدت بیماری را ۴۰/۵ درصد کاهش داد. در تلقیح هم‌زمان با *F. fujikuroi* و *P. fluorescens* (149) کاربرد باکتری آنتاگونیست باعث کاهش شدت بیماری به میزان ۱/۲۶ درصد شد. در مایه‌زنی هم‌زمان با *F. fujikuroi* و *P. fluorescens* (CHA0) اولین علائم چهار روز پس از تلقیح به‌صورت لکه‌های کوچک روی برگ و طوقه برنج ظاهر شد و این باکتری شدت بیماری را به میزان ۳۹/۲۴ درصد کاهش داد. لازم به ذکر است که در همه موارد ذکرشده در بالا در گیاهان برنج شاهد که با آب مقطر سترون مایه‌زنی شده بودند، هیچ‌گونه علائمی مبنی بر بروز بیماری مشاهده نشد.

براساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس در شرایط گلخانه، بین تیمارهای مختلف از نظر صفات شدت بیماری، وزن تر، وزن خشک و ارتفاع بوته اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود داشت. در بین باکتری‌های مورد بررسی، کمترین شدت بیماری به‌ترتیب متعلق به تیمار با باکتری‌های *P. putida* و *B. subtilis* بود که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر و همچنین با سایر باکتری‌های مورد آزمایش نشان دادند. همچنین بیشترین شدت بیماری مربوط به *P. fluorescens* (149) بود که به غیر از شاهد *F. fujikuroi* با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۲).

جدول ۱- مقایسه میانگین درصد مهار رشد میسلیومی *F. fujikuroi* در مطالعات آزمایشگاهی توسط باکتری‌های آنتاگونیست

Table 1- Comparison of means of mycelium growth inhibition percent in laboratory studies using antagonistic bacteria

تیمارها **Treatments**	بازدارندگی رشد در کشت متقابل (درصد) **Growth inhibition in dual culture (%)**	بازدارندگی رشد در متابولیت‌های فرار (درصد) **Growth inhibition in volatile metabolites (%)**	بازدارندگی رشد در روش تولید آنتی‌بیوتیک (درصد) **Growth inhibition in antibiotic production method (%)**	بازدارندگی رشد در روش تولید سیدروفور (درصد) **Growth inhibition in siderophore production method (%)**
Pseudomonas putida	39.92 a	21.14 ab	59.21 a	25.45 cde
Bacillus subtilis	30.22 b	31.01 a	56.27 ab	45.85 ab
Bacillus circulans	28.45 b	18.50 bc	17.55 e	27.1 bcd
Pseudomonas aeruginosa	23.25 bc	28.19 a	45.94 abc	35.45 bc
Pseudomonas fluorescens (149)	16.67 cd	22.27 ab	28.93 de	23.75 de
Pseudomonas fluorescens (CHA0)	10.52 d	17.46 bc	43.42 bcd	17.1 ef
Pseudomonas syringae	9.65 d	10.04 c	32.00 cde	23.75 e
Pseudomonas fluorescens (N47)	9.65 b	30.56 a	34.22 cde	52.1 a

میانگین‌های دارای یک حرف مشترک اختلاف معنی‌داری ($P<0.05$) ندارند.

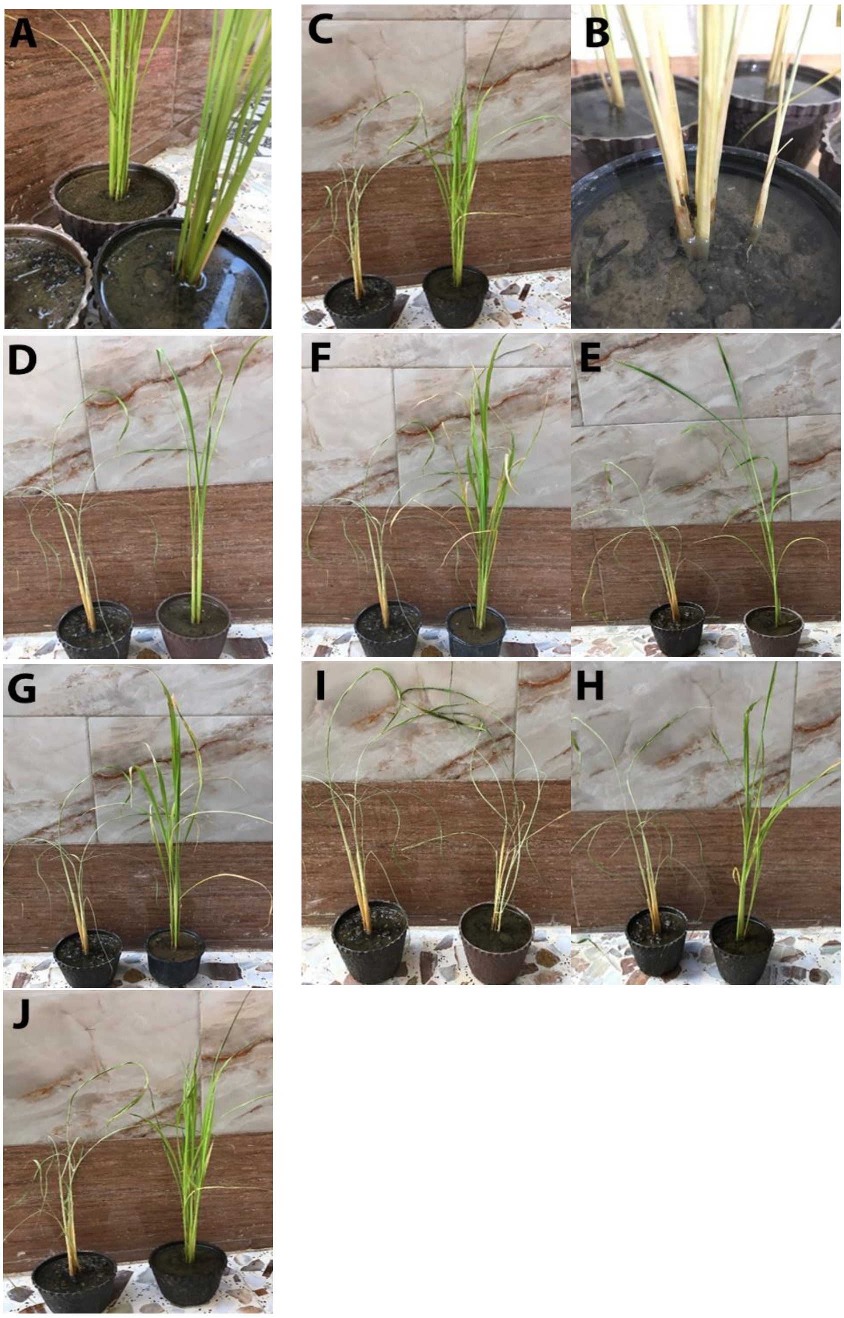
The means having at least one similar letter do not show a significant difference at P=0.05.

در مورد صفت ارتفاع گیاه و بین تیمارهای مورد آزمایش، بیشترین ارتفاع به‌ترتیب مربوط به تیمار با باکتری‌های *P. putida* و *B. subtilis* بود که اولی با همه تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری داشت و دومی به‌جز با *B. circulans* و *P. aeruginosa* با سایر باکتری‌های مورد آزمایش اختلاف معنی‌داری داشت. کمترین ارتفاع گیاه مربوط به تیمار با باکتری‌های *P. syringae*، *P. fluorescens* (149) و *P. fluorescens* (CHA0) بود که با یکدیگر و سایر تیمارها به جز *B. subtilis* اختلاف معنی‌داری نداشتند (جدول ۲). در مورد صفت وزن تر با ریشه بیشترین وزن تر مربوط به تیمار با باکتری *P. putida* بود که با همه تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری داشت. کمترین وزن تر مربوط به تیمار با باکتری‌های *P. fluorescens* (N47) و *P. fluorescens* (CHA0) بود که با تیمارهای *P. putida*، *B. subtilis*، *P. aeruginosa* و *P. syringae* اختلاف معنی‌داری داشتند (جدول ۲).

در مورد صفت وزن تر بدون ریشه بیشترین وزن تر مربوط به تیمار با باکتری *P. putida* بود که با همه تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری داشت. در این مورد کمترین وزن تر مربوط به تیمار با باکتری‌های *P. fluorescens* (N47) و *P. fluorescens* (CHA0) بود که با تیمارهای *P. putida*، *B. subtilis* و *P. syringae* اختلاف معنی‌داری داشتند (جدول ۲). در مورد صفت وزن خشک با ریشه بیشترین وزن خشک مربوط به تیمار با باکتری *P. putida* بود که با همه تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری داشت. در این مورد کمترین وزن خشک مربوط به تیمار با باکتری *P. fluorescens* (CHA0) بود که با تیمارهای *P. putida*، *P. aeruginosa* و *B. subtilis* اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۲). در مورد صفت وزن خشک بدون ریشه بیشترین وزن خشک مربوط به تیمار با باکتری *P. putida* بود که با همه تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری داشت. در این مورد کمترین وزن خشک مربوط به تیمار با باکتری *P. fluorescens* (149) بود که با تیمارهای *P. putida* و *B. subtilis* اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۲).

از میان سه سویه از *P. fluorescens*، سویه (*P. fluorescens* (N47 بهترین عملکرد را نسبت به دو سویه دیگر هم در آزمایشگاه و هم در گلخانه نشان داد که این موضوع خود نشانگر تفاوت در کارآیی سویه‌های مختلف یک گونه باکتریایی در مهار زیستی عوامل بیماری‌زا است.

پاداشت دهکایی و همکاران (۱۶) در مطالعه‌ای در گلخانه در مورد مهار زیستی عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج به این نتیجه رسیدند که هفت سویه از *Bacillus circulans*، *B. subtilis*، *Bucillus* sp.، *Trichoderma harzianum*، *T. virens* (دو سویه) و F.23 (شناسایی نشده)، دارای تأثیر خوبی در کاهش تشکیل پرگنه قارچ روی بذر و گیاهچه بودند و *B. circulans*، بهتر از بقیه آنتاگونیست‌ها عمل کرد و مشخص شد که آغشتن بذر با آنتاگونیست‌ها قبل از آلوده‌سازی با عامل بیماری، تأثیر معناداری در کاهش آلودگی نسبت به به‌کارگیری آنتاگونیست‌ها بعد از آلوده‌سازی با عامل بیماری داشته است.



شکل ۱- نمایی از مطالعات گلخانه‌ای: علائم بیماری روی برنج: A: پس از مایه‌زنی با آب مقطر سترون، B: پس از مایه‌زنی با *F. fujikuroi*، C: پس از مایه‌زنی با *F. fujikuroi* و *B. subtilis*، D: پس از مایه‌زنی با *F. fujikuroi* و *B. circulans*، E: پس از مایه‌زنی با *F. fujikuroi* و *P. putida*، F: پس از مایه‌زنی با *F. fujikuroi* و *P. syringae*، G: پس از مایه‌زنی با *F. fujikuroi* و *P. aeruginosa*، H: پس از مایه‌زنی با *F. fujikuroi* و *P. fluorescens* (N47)، I: پس از مایه‌زنی با *F. fujikuroi* و *P. fluorescens* (149)، J: پس از مایه‌زنی با *F. fujikuroi* و *P. fluorescens* (CHA0).

Figure 1- Schema of greenhouse studies: Symptoms of disease on rice: A: After inoculation with distilled water, B: After inoculation with *F. fujikuroi*, C: After inoculation with *F. fujikuroi* and *B. subtilis*, D: After inoculation with *F. fujikuroi* and *B. circulans*, E: After inoculation with *F. fujikuroi* and *P. putida*, F: After inoculation with *F. fujikuroi* and *P. syringae*, G: After inoculation with *F. fujikuroi* and *P. aeruginosa*, H: After inoculation with *F. fujikuroi* and *P. fluorescens* (N47), I: After inoculation with *F. fujikuroi* and *P. fluorescens* (149), J: After inoculation with *F. fujikuroi* and *P. fluorescens* (CHA0).

جدول ۲- مقایسه میانگین شدت بیماری پوسیدگی طوقه برنج، ارتفاع بوته، وزن تر و وزن خشک گیاه در گلخانه در حضور باکتری‌های آنتاگونیست

Table 2- Comparison of means of disease rating, height, fresh weight and dry weight of plant in greenhouse in the presence of antagonist bacteria

تیمارها Treatments	شدت بیماری Disease rating	ارتفاع بوته Height (سانتی‌متر) (cm)	وزن تر (با ریشه) Fresh weight (with root) گرم (gr)	وزن تر (بدون ریشه) Fresh weight (without root) گرم (gr)	وزن خشک (با ریشه) Dry weight (with root) گرم (gr)	وزن خشک (بدون ریشه) Dry weight (without root) گرم (gr)
B. subtilis	4.33 c	74.66 c	15 cd	3.50 c	3.00 c	1.83 c
B. circulans	6.16 c	67.66 cd	12.66 ef	2.86 cde	2.33 cd	1.33 cde
P. aeruginosa	5.77 e	69.66 cde	13.66 e	3.16 e	2.83 e	1.83 e
P. syringae	6.06 f	66.33 d	14 cd	3.50 c	2.83 cd	1.66 cd
P. putida	3.06 b	77.66 b	16.66 b	5.00 b	4.16 b	2.50 b
P. fluorescens (149)	7.80 g	66.33 d	12.64 ef	2.66 de	2.33 cd	1.16 de
P. fluorescens (N47)	4.73 d	64.66 d	12.33 f	3.16 cd	2.33 cd	1.33 cde
P. fluorescens (CHA0)	4.83 d	66.33 d	12.33 f	2.66 de	2.16 d	1.33 cde
شاهد *F. fujikuroi* control	7.96 g	60.66 e	9.33 g	2.16 e	2.16 d	1 e
شاهد آب مقطر Distilled water control	1 a	87.33 a	19.66 a	8.33 a	5.33 a	3.16 a

در این تحقیق از میان هشت سویه‌ای که در آزمایشگاه تاثیر خوبی علیه *F. fujikuroi* نشان دادند، همه سویه‌ها در شرایط گلخانه‌ای نیز فعالیت آنتاگونیستی داشتند که *P. putida* با کاهش شدت بیماری به میزان ۶۲/۰۲ درصد و نیز افزایش ارتفاع، وزن تر و وزن خشک گیاه، موثرترین آنتاگونیست در بررسی‌های گلخانه‌ای است که نتیجه تحقیق حاضر به دلایل مختلف از جمله وجود جنس‌ها و گونه‌های مختلف باکتریایی، تفاوت در شرایط محیطی و خصوصیات ژنتیکی میزبان، مطابقت زیادی با تحقیقی که توسط محققان فوق صورت گرفت، ندارد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده از بررسی‌های بیوکنترل در آزمایشگاه و گلخانه، سویه‌های *P. putida* و *B. subtilis* موثرترین باکتری‌ها در کنترل بیماری پوسیدگی طوقه برنج هستند.

منابع

1- Barraquio W.L., Ladha, J.K., and Watanabe I. 1983. Isolation and identification of N2-fixing Pseudomonas associated with wetland rice. Canadian Journal of Microbiology 29(8): 867-873.

2- Bertrand P.F., and Gottwald T.R. 1997. Evaluation of fungicides for pecan disease control. In: Hickey, K. D., (ed), Methods for Evaluating Pesticides for Control of Plant Pathogens. Oxford and IHB Publisher, Calcatte, India pp. 179-181.

3- de Boer M., Bom P., Kindt F., Keurentjes J.J., van der Sluis I., Van Loon L.C., and Bakker P.A. 2003. Control of Fusarium wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have different disease-suppressive mechanisms. Phytopathology 93(5): 626-632.

4- Fiddaman P.J., and Rossal S. 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus*. Journal of Applied Bacteriology 74(2): 119-126.

5- Geels F.P., and Schippers B. 1983. Reduction of yield depressions in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatments with antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. Journal of Phytopathology 108(3-4): 207-214.

6- Hua J.L., Li X.M., and Luo R.H. 2004. Identification of antagonistic bacterial strain B-77 and its control effect against rice bakanae. Acta Agriculturae Jiangxi 3: 62-64.

7- Jamali F., Sharifi Tehrani A., Akhovat M., and Zakeri Z. 2005. Effect of several bacteria antagonists on *Fusarium oxysporum*, the causal agent of Fusarium wilting of Iranian pease in greenhouse conditions. Iranian Journal of Agricultural Science 36(3): 711-717. (In Persian with English abstract)

8- Kannahi M., Malathi P., Kannahi M., and Malathi P. 2013. Antagonistic effect of tomato rhizospheric microbes against some pathogens. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research 5(9): 10-14.

9- Kazempour M.N., and Anvari M. 2009. Isolation of *Fusarium fujikuroi* antagonistic bacteria and cloning of its phenazine carboxylic acid genes. African Journal of Biotechnology 8(23): 6506-6510.

10- Kazempour M.N., and Elahinia S.A. 2007. Biological control of *Fusarium fujikuroi*, the causal agent of bakanae disease by rice associated antagonistic bacteria. Bulgarian Journal of Agricultural Science 13(4): 393-408.
11- Kraus J., and Loper J.E. 1992. Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of Pythium damping-off of cucumber. Phytopathology 82(3): 264-271.
12- Kumar M.N., Laha G.S., and Reddy C.S. 2007. Role of antagonistic bacteria in suppression of bakanae disease of rice caused by *Fusarium moniliforme* Sheld. Journal of Biological Control 21(1): 97-104.
13- Lu F., Chen Z.Y., and Liu Y.F. 1999. Effect of antagonistic bacteria against rice bakanae and on rice yield. Chinese Journal of Biological Control 15: 59-61.
14- Matić S., Spadaro D., Garibaldi A., and Gullino M.L. 2014. Antagonistic yeasts and thermotherapy as seed treatments to control *Fusarium fujikuroi* on rice. Biological Control 73: 59-67.
15- Nourozian J., Etebarian H.R., and Khodakaramian G. 2006. Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. Songklanakarin Journal of Science and Technology 28(Suppl 1): 29-38.
16- Padasht Dehkaee F., Mansouri Jajai Sh., and Rouhani H. 2004. Effect of anagonist microorganisms in Guilan rice farms Soils on rice footrot disease. Journal of Agricultural Science and Technology 8(1): 213-221. (In Persian with English abstract)
17- Rosales A.M., and Mew T.W. 1997. Suppression of *Fusarium moniliforme* in rice by rice-associated antagonistic bacteria. Plant Disease 81(1): 49-52.
18- Schaad N.W., Jonse J.B., and Chun W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edition, APS Press.
19- Sivakumar D., Wijeratnam R.W., Wijesundera R.L.C., Marikar F.M.T., and Abeyesekere M. 2000. Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* on postharvest pathogens of rambutan (*Nephelium lappaceum*). Phytoparasitica 28(3): 240-247.
20- Thara K.V., and Gnanamanickam S.S. 1994. Biological control of rice sheath blight in India: Lack of correlation between chitinase production by bacterial antagonists and sheath blight suppression. Plant and Soil 160(2): 277-280.

Journal of Plant Protection
Vol. 34, No. 3, Fall 2020, P. 287-295

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹، ص. ۲۹۵-۲۸۷

Biological Control of *Fusarium fujikuroi*, the Causal Agent of Bakanae Using Some Antagonistic Bacteria in Guilan Province

M.R. Safari Motlagh[1]*- M. Dashti[2]
Received: 09-06-2019
Accepted: 12-10-2020

Introduction: Rice bakanae disease caused by *Fusarium fujikuroi* is one of the most important diseases of rice in Iran and in the world. Studies show that the disease has spread to a wide range of paddy fields worldwide, with losses in Japan up to 20%, in India up to 15%, and Thailand's northern and central areas have been reported to be 7.3% -14.7%. Symptoms include rice foot blackness and yellowish and then wilting of infected plants. The pathogen is more likely to attack the foot rot which is a sign of the abnormal growth of contaminated plants in the farm. Infected seedlings are slender and taller than healthy plants, and highly infected plants may die before or after transplantation. The tillering is reduced, consequently the leaves die in a short time. The fungus causes the disease threats the human and animal health through the production of phytotoxins. Identification of *Fusarium* species is currently confusing, on the other hand, several *Fusarium* species have always been isolated together with rice contaminated with the disease. Therefore, it is not clear which species of this fungus are the main reason of the disease. This fungus is soil-borne and has a long life in heavy soils. It has also a global expansion and is active in most parts of the world. Rice foot rot disease in all major rice producing countries in the world is considered as a seed disease and the transmission of the disease agent from one season to another season is mainly due to contaminated seed, but soil-borne fungus can be as well. Currently, treating the seeds with fungicides is the best method to control this disease, however using chemical pesticides can lead to environmental pollution. In this situation, it is important to achieve a healthy alternate method. For this purpose, biological control is one of the ways in which today a large investment is being made around the world.

Materials and Methods: Samples of rice exhibiting the symptoms of bakanae were randomly collected from different parts of Guilan province, Iran. Pieces of organs with rot symptoms were cut and they were surface-disinfected after washing with 0.5% sodium hypochlorite solution. At the next step, they were washed with distilled water and dried on filter papers. Then, they were cultured in Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA) culture medium and were placed in an incubator at 28°C for 3-5 days. Afterward, they were placed on a water-agar medium for purification and morphological identification. In this research, from a total of 80 samples collected from rice farms in Guilan province, 18 bacterial strains were isolated and the antagonistic ability of 8 strains of bacteria in the laboratory and greenhouse was investigated. For this purpose, in laboratory, dual culture method, volatile compounds, siderophore and antibiotic production were used. These bacterial strains were inoculated into rice under greenhouse conditions, and then the severity of the disease was determined in the tested treatments. After calculating the severity of the disease, the height of the rice bushes was measured by the ruler. To measure the fresh weight, the rice bush with the roots was removed from the soil and measured by a scale. Each bush was then separately placed for 48 hours in an oven at 80-90°C. After leaving the oven, each of the bushes was re-weighed. This weight was recorded as dry weight.

Results and Discussion: A total of 18 isolated bacterial strains, 8 bacterial strains including *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* (N47), *Pseudomonas fluorescens* (149) and *Pseudomonas fluorescens* (CHA0) were identified and used for biological control studies in laboratory and greenhouses. P. putida with 39.99 % in the dual culture, *B. subtilis* with 31.01% in the volatile metabolites, in the method of siderophore production, *P. fluorescens* (N47) and *B. subtilis* with 52.10 % and 45.85 % respectively, and in the antibiotic production, *P. putida* with 59.21% had the greatest effect on inhibiting the mycelial growth of the disease causative agent. Based on the results of the analysis of variance under greenhouse conditions, there was a significant difference between treatments for severity of disease, fresh weight, dry weight and plant height at 1% probability level. Among the studied bacteria, the least severity of the disease belonged to the treatment with *P. putida* and *B. subtilis*, respectively. Regarding height, the highest height was related to treatment with *P. putida* and *B. subtilis* and in terms of fresh weight and dry weight, the highest weight was related to *P. putida*.

1- Associate Professor, Department of Plant Protection, Rasht Branch. Islamic Azad University, Iran
(*- Corresponding Author Email: ssafarimotlagh@yahoo.com)
2- Graduated of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Deylaman Institute for High Education, Lahijan, Iran

Conclusion: According to the results of biocontrol studies in laboratory and greenhouse conditions, *P. putida* and *B. subtilis* strains were the most effective bacteria for controlling rice foot-rot disease. Therefore, isolating and identifying these bacterial strains as much as possible can be promising for the greater effectiveness of biocontrol methods in the management of rice crown-rot disease control.

Keywords: Antagonistic bacteria, Biological control, *Fusarium fujikuroi*, Rice